บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อาหารทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คืออาหารข้นที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งโปรตีนแทนที่กากถั่วเหลืองในอาหารข้นที่มีโปรตีนรวม 16 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับ 0, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารสูตรควบคุมใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีน 100 เปอร์เซ็นต์ (กากเมล็ดฝ้าย 0 เปอร์เซ็นต์) ทำการลดระดับกากถั่วเหลืองลง 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และแทนที่โดยกากเมล็ดฝ้ายจนมีระดับโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ในทุกสูตรอาหารทดลองใช้มันเส้นเป็นแหล่งพลังงาน (ตามตารางที่ 10)

กากเมล็ดฝ้ายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นกากเมล็ดฝ้ายกระเทาะเปลือกที่ผ่านกระบวนการสกัดน้ำมันโดยสารเคมี (กากเมล็ดฝ้ายสกัดน้ำมัน) ซื้อจากบริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด จ.นนทบุรี ราคากิโลกรัมละ 5.40 บาท

3.1 องค์ประกอบทางโภชนะและปริมาณสารกอสซิปอลอิสระ

3.1.1 องค์ประกอบทางโภชนะ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีใน กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง มันเส้น ฟางข้าว และอาหารทดลองที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งโปรตีนแทนที่กากถั่วเหลืองที่ระดับ 0, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้ วัตถุแห้ง (DM) อินทรียวัตถุ (OM) โปรตีนรวม (CP) เยื่อใยรวม (CF) ไขมัน (EE) และคาร์โบไฮเดรทที่ย่อยง่าย (NFE) โดยวิธี Proximate analysis (AOAC., 2000) และโปรตีนแท้ (TP) (Barnstein, 1900)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 ปริมาณสารกอสซิปอลอิสระ

วิเคราะห์หาปริมาณสารกอสซิปอลอิสระ (free gossypol) ในกากเมล็ดฝ้าย และอาหารทดลองอาหารทดลองที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งโปรตีนแทนที่กากถั่วเหลืองที่ระดับ 0, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ AOCS Official Method Ba 7-58 (1988)

ตารางที่ 10 แสดงส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งโปรตีนแทนที่กากถั่วเหลืองที่ระดับ 0, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์

Treatment	1	2	3	4
Replaced SBM by CSM (%)	0	50	75	100
Material				
Soybean meal	33.44	16.72	8.36	0.00
Cottonseed meal	0.00	18.13	27.19	36.26
Casava ship	62.56	61.15	60.45	59.74
Dicalcium-phosphate	2.00	2.00	2.00	2.00
Salt	1.00	1.00	1.00	1.00
Premix	1.00	1.00	1.00	1.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
% CP[1]	16.00	16.00	16.00	16.00
Price (Bath/kg)	6.00	5.06	4.58	4.11

[1] จากการคำนวณ

3.2 การศึกษาการย่อยได้โดยวิธี Cellulase technique

ศึกษาการย่อยได้ของวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุของกากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และอาหารทดลองที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งโปรตีนแทนที่กากถั่วเหลืองที่ระดับ 0, 50, 75 และ 100 โดยวิธี Cellulase technique (ภาพที่ 11) ตามวิธีการของ De Boever *et al*. (1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างอาหารมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง แล้วบดให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร ชั่งตัวอย่างอาหาร 300 มิลลิกรัม ใส่ใน glass filter-crucible เติม pepsin-hydrochloric acid solution ที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่า crucible ทุก 5 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง นำ crucible ไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที แล้วทำการดูดสารละลายออก และล้างกากอาหารด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติม cellulase-buffer solution ที่มีอุณหภูมิ

40 องศาเซลเซียส 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่า crucible ทุก 5 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายออกและล้างกากอาหารด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกากอาหารที่ไม่ย่อยไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เพื่อหาค่าวัตถุแห้ง และนำกากไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เพื่อหาค่าอินทรียวัตถุ

3.2.2 การคำนวณหาการย่อยได้

คำนวณหาการย่อยได้ของวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุ จากสมการ

$$\text{digestibility (\%)} = \frac{Wo - Wt}{Wo} \times 100$$

เมื่อ Wo = ปริมาณโภชนะในอาหารก่อนการย่อย

Wt = ปริมาณโภชนะในกากอาหารหลังการย่อย

3.2.3 การคำนวณหาค่าพลังงานเมทาบอไลซ์ (ME) และค่าพลังงานสุทธิเพื่อการให้นม (NE_L)

นำค่าการย่อยได้ของอินทรียวัตถุ (organic matter digestibility, OMD) ที่ได้และไขมัน (EE) ไปคำนวณเป็นค่าพลังงานเมทาบอไลซ์ (matabilizable energy, ME) และค่าพลังงานสุทธิเพื่อใช้ในการให้นม (net energy for lactation, NE_L) โดยใช้สมการที่ De Boever *et al*. (1986) ได้เสนอไว้ ดังนี้

$$ME\ (MJ/kgDM) = 0.150 \times OMD + 0.241 \times EE - 0.99 \quad (R^2 = 0.96)$$

$$NE_L\ (MJ/kgDM) = 0.112 \times OMD + 0.159 \times EE - 2.37 \quad (R^2 = 0.96)$$

3.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1980)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การศึกษาการย่อยได้ในกระเพาะรูเมนโดยวิธี Nylon bag technique

ศึกษาการย่อยได้ของวัตถุแห้งและอินทรียวัตถุของกากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และอาหารทดลองที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งโปรตีนแทนที่กากถั่วเหลืองที่ระดับ 0, 50, 75 และ 100 โดยวิธี Nylon bag technique (ภาพที่ 12) ตามวิธีการของ Ørskov and McDonald (1979)

3.3.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองใช้โคนมลูกผสม (โฮลสไตนฟรีเซี่ยน X พื้นเมือง) เพศผู้ตอน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 210 กิโลกรัม จำนวน 4 ตัว โดยโคทุกตัวได้รับการผ่าตัดใส่ท่อเก็บตัวอย่างจากทางเดินอาหาร (เทอดชัย และทัศนีย์, 2531) ที่กระเพาะรูเมน (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2530) ที่ลำไส้เล็กส่วนต้น และที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ทัศนีย์ และเทอดชัย, 2532)

3.3.2 วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างอาหารมาบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร ใช้ถุงไนลอนขนาด 7 x 15 เซนติเมตร ที่มีขนาดรูของถุง (pore size) 40 ไมโครเมตร ชั่งตัวอย่างอาหาร 3 กรัม ใส่ลงในถุงไนล่อนที่ทราบน้ำหนักคงที่ และนำไปหมักย่อยในส่วนล่างของกระเพาะรูเมน โดยใช้เวลาในการหมักย่อย 7 ระยะเวลา คือ 2, 4, 8, 16, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แต่ละระยะจะทำซ้ำ 2 ถุง เมื่อครบกำหนดเวลาเอาถุงออกจากกระเพาะรูเมน สำหรับตัวอย่างอาหารที่หมักย่อยที่เวลา 0 ชั่วโมง ทำโดยการนำถุงที่ใส่อาหารไปแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำถุงทั้งหมดมาซักทำความสะอาดด้วยเครื่องซักผ้านาน 15 นาที นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เอากากอาหารที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงเพื่อหาปริมาณวัตถุแห้ง นำกากอาหารส่วนหนึ่งไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณอินทรียวัตถุ และนำกากอาหารส่วนที่เหลือไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม และโปรตีนแท้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 การคำนวณหาปริมาณโภชนะที่สลายตัวในกระเพาะรูเมน

คำนวณหาปริมาณโภชนะที่สลายตัว (disappearance) ในกระเพาะรูเมนที่เวลาการหมักบ่มต่าง ๆ จากสมการ ต่อไปนี้

$$\text{โภชนะที่สลายตัวในกระเพาะรูเมน (\%)} = \frac{Wo - Wt}{Wo} \times 100$$

เมื่อ Wo = ปริมาณโภชนะในอาหารก่อนการหมักย่อย

Wt = ปริมาณโภชนะในกากอาหารหลังการหมักย่อย

เมื่อได้ค่าการสลายตัวของโภชนะที่ชั่วโมงต่าง ๆ นำไปคำนวณหาค่าการย่อยสลาย และพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการย่อยสลายของโภชนะ โดยโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY (Chen, 1997) จากสมการที่เสนอโดย Ørskov and McDonald (1979) คือ

$$P = a + b \times (1 - e^{-ct})$$

เมื่อ P = ค่าการย่อยสลายได้ที่ช่วงเวลาต่างกัน (%)

a = ส่วนที่ละลายได้ทันที (%)

b = ส่วนที่ละลายไม่ได้แต่สามารถเกิดกระบวนการหมักได้ (%)

e = log ฐาน 10

c = อัตราการย่อยสลายของ b (h^{-1})

t = ช่วงระยะเวลาในการหมักบ่ม

หลังจากการคำนวณค่าการสลายตัวโดยโปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY จะได้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการสลายตัวในกระเพาะรูเมน ได้แก่ ค่า a คือส่วนที่ละลายได้ทันที (immediately soluble fraction) ค่า b คือส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ (degradability of insoluble fraction) ค่า a+b คือความสามารถในการย่อยสลายได้ (potential degradability) ค่า c คืออัตราการย่อยสลาย (degradation rate) ค่า L คือช่วงเวลาที่เริ่มถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Lag time) และ $ED_{0.02}$ $ED_{0.05}$ และ $ED_{0.08}$ คือประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Effective degradation) ที่อัตรา 0.02, 0.05 และ 0.08 ส่วนต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1980)

ภาพที่ 11 การศึกษาการย่อยได้โดยวิธี Cellulase technique

ภาพที่ 12 การศึกษาการย่อยได้ในกระเพาะรูเมนโดยวิธี Nylon bag technique

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การศึกษาการย่อยได้ในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารในตัวสัตว์ทดลอง โดยวิธีการใช้สารบ่งชี้ (Indicator method)

3.4.1 สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลองชุดเดียวกับการศึกษาการย่อยได้ในกระเพาะรูเมน โดยวิธี Nylon bag technique (3.3.1)

3.4.2 อาหารและการให้อาหาร

อาหารข้น คือ อาหารทดลองที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งโปรตีนแทนที่กากถั่วเหลืองในอาหารข้นที่มีโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับ 0, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และอาหารหยาบที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ ฟางข้าว

ให้อาหารในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว (วัตถุแห้ง) โดยแบ่งเป็นอาหารข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และอาหารหยาบ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง ๆ ละเท่ากัน เวลา 06.00 น. และ 18.00 น. (แต่ละครั้งห่างกัน 12 ชั่วโมง)

3.4.3 วิธีการทดลอง

ใช้โคทดลองจำนวน 4 ตัว วางแผนการทดลองแบบ Latin square 4 × 4 โดยอาหารที่ใช้มี 4 ระดับ จำนวน 4 ช่วงการทดลอง แต่ละช่วงใช้เวลา 20 วัน โดย 14 วันแรก เป็นระยะการปรับตัว (preliminary period) คือ เป็นช่วงที่ปล่อยให้โคและจุลินทรีย์ปรับตัวเข้ากับอาหารและขับถ่ายอาหารเดิมในทางเดินอาหารออกให้หมด และ 6 วันสุดท้ายเป็นระยะการเก็บข้อมูลการทดลอง (collection period) โดยเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่กินในแต่ละช่วงเวลาให้อาหารทุกวัน เก็บ ตัวอย่างอาหาร (digesta) ที่เดินทางผ่านท่อเก็บตัวอย่างอาหารที่ลำไส้เล็กทั้ง 2 แห่ง คือ ลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (terminal ileum) แห่งละ 600 และ 400 กรัม ตามลำดับ ทุก ๆ ชั่วโมงหลังจากกินอาหาร (ตารางที่ 11) บันทึกน้ำหนักมูลทันทีทุกครั้งที่มีการถ่ายมูล ทำการกวนมูลให้เข้ากันดีหลังจากนั้นเก็บตัวอย่างมูลเอาไว้ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมูลทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการวัดความเป็นกรด–ด่างในกระเพาะรูเมน (rumen pH) โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) วัดบริเวณ ventral sac ของกระเพาะรูเมน (เทอดชัย, 2530 ก ; 2530 ข) และการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) โดยสุ่มเก็บทั่วกระเพาะรูเมนอย่างน้อย 5 แห่ง เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนีย (ammonia-N)

การวัดและเก็บตัวอย่างในช่วง 6 วันสุดท้ายของการทดลอง (collection period) วันละ 4 ครั้ง ตามวันและเวลาที่แสดงในตารางที่ 11 จากตารางการเก็บตัวอย่างจะได้ตัวแทนของความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมน ของเหลวจากกระเพาะรูเมน อาหารในลำไส้เล็กส่วนต้น (proximal duodenum) และอาหารในลำไส้เล็กส่วนปลาย (terminal ileum) หลังจากกินอาหาร 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ชั่วโมง (2 ซ้ำ) นำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน อาหารจากลำไส้เล็ก และมูลไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสทันที เพื่อยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ และนำไปวิเคราะห์วัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ และโปรตีนรวม โดยวิธี Proximate analysis (AOAC., 2000) โปรตีนแท้ (Barnstein, 1900) แอมโมเนียจากของเหลวในกระเพาะรูเมน (FAO, 1986) และไททาเนียมไดออกไซด์ (Brandt *et al*.,1983)

ตารางที่ 11 แสดงวันและเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างอาหาร

วันที่	1	2	3	4	5	6
ครั้งที่ 1	06.00 น.	07.00 น.	08.00 น.	09.00 น.	10.00 น.	11.00 น.
ครั้งที่ 2	12.00 น.	13.00 น.	14.00 น.	15.00 น.	16.00 น.	17.00 น.
ครั้งที่ 3	18.00 น.	19.00 น.	20.00 น.	21.00 น.	22.00 น.	23.00 น.
ครั้งที่ 4	24.00 น.	01.00 น.	02.00 น.	03.00 น.	04.00 น.	05.00 น.

3.4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) ใช้แผนการทดลองแบบ 4 X 4 Latin square จำนวน 4 ช่วงการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1980)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

1. ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทดลอง หมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ใช้เวลาในการทดลอง 12 เดือน ระหว่างพฤศจิกายน 2544 – ตุลาคม 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved